

**Gyógyszeres és sebészi beavatkozások iszkémia-reperfúziós károsodásokra gyakorolt  
hatásának vizsgálata kétoldali akut végtag iszkémia állatmodellen**

Ph.D. Tézis

**Dr. Nagy Tibor**

Doktori Iskola vezetője:	Prof. Dr. Kovács L. Gábor
Programvezető:	Dr. Jancsó Gábor
Témavezető:	Dr. Arató Endre



Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar  
Sebészeti Oktató és Kutató Intézet

Pécs, 2015

## 1. Bevezetés

A kardiovaszkuláris betegségekben szenvedő betegek jelentős hányadában a revaszkularizációs műtét az egyetlen lehetőség a normál funkció helyreállítására, azonban a reperfúzió pillanatában fellépő volumen és nyomásterhelés, oxidatív stressz és a kialakuló reperfúziós károsodás gyakran szövődmények kialakulásához vezet. Az érsebészeti kórképek közül az akut végtagiszkémia súlyos, potenciálisan életet veszélyeztető kórállapot. Ebben az állapotban feltétlenül szükséges a gyors revaszkularizáció. Az akut iszkémia időtartama is fontos tényező, mivel a keringés helyreállítását követően mindig kell számolnunk különböző mértékű reperfúziós károsodással. A reperfúziós károsodás súlyossága az iszkémiás időtől, az iszkémiás szövet mennyiségétől és az érintett szövet kollaterális keringésétől függ. A sebészeti kutatásokban valós klinikai jelentősége van a reperfúziós károsodás kialakításában résztvevő jelátviteli utak felderítésének és az ezekbe történő beavatkozásnak. [1, 2, 3] Az oxigén eredetű szabadgyökök reperfúziós károsodásban betöltött szerepe jól ismert, így ezek produkciójának csökkentése, vagy eliminációjuk gyorsítása nagyon fontos. Az endogén antioxidáns védelem első vonalába a kataláz, szuperoxid dizmutáz (SOD), glutathion peroxidáz és repair enzimek tartoznak, azonban a közelmúltban a kutatások fókuszába- egyéb antioxidáns enzimek mellett- a glutathion S-transzferáz (GST) került. A reperfúziós károsodás a szövetek iszkémiát követő vérkeringés-helyreállításra adott összetett válasza, mely mechanikai-, extra-, és intracelluláris folyamatokat foglal magában. Ezek a folyamatok a reperfúzió első pillanataiban indulnak és potenciálisan napokig tarthatnak. A reperfúziós károsodás patogenezisének modern hipotézisét Piper és munkatársai fogalmazták meg. [4] Az akut verőér elzáródásban szenvedő betegek esetében széleskörűen elfogadott tény, hogy az elzáródott ér periodikus újramegnyitása és elzárása következtében csökken a nekrosis kiterjedése, valamint csökken a rövid és hosszútávú mortalitás. A szöveti iszkémia-reperfúzió különböző típusú sejthalálhoz vezethet, úgy, mint apoptózis és nekrosis. [5]

A szívizom iszkémia-reperfúziós károsodásokkal szembeni védelmére az iszkémiás poszt kondicionálás egy jól ismert módszer. [6] Az iszkémiás poszt kondicionálás koncepcióját elsőként Vinten-Johansen munkacsoportja fogalmazta meg. [7] Általánosságban elmondható, hogy az iszkémiás poszt kondicionálás a koronária-áramlás intermittáló megszakítása a reperfúziós fázis legelején, mely a reperfúziós károsodások elleni védelem kialakításához vezet. Az alkalmazott iszkémiás poszt kondicionálás protokolljának kiadologozása, finomhangolása a korai poszt kondicionálással foglalkozó kutatások fő célkitűzése volt.

A glutathion S-transzferázok (GST) az endogén antioxidáns enzimrendszer tagjai. A GST-k 3 nagy fehérjecsaládot alkotnak úgy, mint citoszolikus, mitokondriális és

mikroszómális transzferázok, amelyek közül a citoszólikus család a legnagyobb. [8] A közelmúlt publikációiban megfogalmazták, hogy ezek az enzimek katalizálják a redukált glutation (GSH) elektrofil komponensekkel történő konjugációját, így részt vesznek a különböző endogén- és exogén ágensek detoxifikálásában. [9, 10] A GST-k néhány izoenzimeről bizonyítást nyert, hogy részt vesznek különböző sejt-túlélést és sejt-halált irányító jelátviteli utak szabályozásában is. Ebben a nem enzimatis folyamatban a GST szerepe, hogy a mitogén aktivált protein kinázt (MAPK) egy fehérjekomplexben tartsa, így megelőzve a MAPK hatásait további célmolekulákon. [11]

Az etakrinsav (EA) egy a klinikumban használatos diuretikum, mely emellett potens GST-gátló hatással is rendelkezik. Több ponton és több mechanizmussal is képes gátolni a GST-k működését. [12]

A peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor-gamma (PPARG) a nukleáris receptor-szupercsalád tagja. A PPAR-ok ligand-függő transzkripció faktorok, melyek a szabályozandó gén enhancer régiójának specifikus peroxiszóma proliferátor reszponzív elementjeihez kötődnek. [13] Részt vesznek a zsírsejt differenciáció irányításában, az inzulin- szenzitivitás és gyulladásos folyamatok szabályozásában, [14, 15] valamint az NF- $\kappa$ B-függő gyulladásos gének transzkripciójának gátlása révén down-regulálják a makrofágok proinflammatorikus mediátor-termelését. [16, 17, 18] Szintetikus PPARG agonisták (PPARGA) a nem-inzulinfüggő diabetes mellitus kezelésében használt orális antidiabetikumok egy csoportja is. [19] Újkeletű evidenciaként tartjuk számon, hogy a PPARG aktiváció képes szabályozni a gyulladásos válaszreakciókat, receptor-függő transzrepresszió révén képes számos proinflammatorikus molekula expresszióját gátolni. [20] Ezen folyamatok mellett a PPARG agonisták iszkémia-reperfúziós károsodásokkal szembeni jótékony hatásáról több közlés is született a bél, [21, 22, 23] tüdő, [24] szív, [25, 26, 27] vese [28] és agy [29, 30] tekintetében.

A pentoxifyllin (PTX) egy nem specifikus foszfodiészteráz-gátló, mely régóta használatos a klaudikáció intermittens kezelésére alsó végtagi verőérbetegeken. [31] Hemoreológiai hatásai révén képes a vörösvérsejtek konformációját megváltoztatni, ezáltal növelni a mikrocirkulációs vérátáramlást krónikus artériás elégtelenség esetén. Újabban a PTX alkalmazása kibővült, képes a gyulladásos válaszreakció csökkentésére. A PTX-el foglalkozó kutatások napjainkban erre az anti-inflammatorikus hatásra fókuszálnak.

## 2. Célkitűzés

**Az első kísérletben** kétoldali alsó végtagi akut iszkémiát hoztunk létre az infrarenális hasi aorta kirekesztésével, majd reperfúzió történt. A kísérletben vizsgáltuk a GST EA-val történő gátlásának iszkémia-reperfúziós károsodásokra, valamint az iszkémiás poszt kondicionálás védő hatására gyakorolt befolyását. Meghatároztuk a kialakuló oxidatív stressz és gyulladásos válasz mértékét, továbbá az izomszövet strukturális változásait. Vizsgálatok történtek továbbá különböző pro- és antiapoptotikus jelátviteli utak irányában.

**A második kísérletsorozat** célkitűzése volt, hogy megvizsgáljuk egy PPARGA hatását alsó végtagi akut iszkémia állatmodellünkön. Két nagy vizsgálatot végeztünk, hatás-idő és dóziszvizsgálatokat annak feltérképezése érdekében, hogy a szert mely időpontban és mely dózisban alkalmazzuk a legkedvezőbb hatás elérése érdekében. Vizsgáltuk az oxidatív stressz paramétereit (MDA, GSH, -SH, SOD), valamint PCR analízissel detektáltuk a SOD-mRNS és a PPARG-mRNS expressziós mintázatát. Az érintett izmok strukturális vizsgálatára szövettani metszeteket készítettünk.

**A harmadik kísérletben** a foszfodiészteráz-gátló PTX hatásait vizsgáltuk infrarenális aorta elzáródást és reperfúziót követően. Hypotézisünk szerint a „single-shot”, emelt dózisú PTX alkalmazása képes csökkenteni az iszkémia-reperfúziós károsodásokat, valamint a helyi és szisztémás gyulladásos válasz nagyságát. Vizsgálataink során meghatároztuk az oxidatív stressz paramétereit (MDA, GSH, -SH, SOD), valamint a gyulladásos válasz mértékét (TNF-alfa, IL-6).

## 3. Anyagok és módszerek

### 3.1. Állatmodell

200-250 g közötti hím Wistar patkányokon végeztük a kísérleteket, melyeket Charles River Breeding Laboratories-től szereztünk be. Az állatokat egyéni ketrecekben hőmérséklet- és fény szabályozott, légkondicionált teremben tartottuk, ahol szabadon juthattak folyadékhoz és táplálékhoz. A tápot 12 órával a vizsgálatok előtt megvontuk az állatoktól.

### 3.2. Aorta iszkémia-reperfúziós modell

Az állatok anesztéziája intraperitoneálisan adott ketamin (500 mg / 10 ml) és diazepam (10 mg / 2 ml) 1:1 (0,2 ml / 100 g = 5 mg ketamin + 0,5 mg diazepam / 100 g) arányú keverékével történt. EKG-t helyeztünk fel, valamint a karotisz artériát kanüláltuk (22 gauge) a vérnyomás monitorozása céljából. A bőrt fertőtlenítettük, majd medián laparotomiát végeztünk. 2 ml meleg fiz. sóoldatot injektáltunk a hasüregbe a folyadék egyensúly fenntartása érdekében. A v.

mesenterica inferiort kanüláltuk a gyógyszerbeadás, vérvételek és a folyadékpótlás céljából. A bélkacsokat balra eltartva kipreparáltuk a hasi aorta infrarenalis szakaszát, majd az aortára mikrovaskuláris érleszorítót helyeztünk fel 60 percre. A hasüreget ezután reverzibilisen zártuk és meleg fiz. sóoldatos törlőt helyeztünk a sebre. Az iszkémiás idő elteltével megnyitottuk a hasüreget és a mikrovaskuláris érfogót eltávolítottuk az aortáról, majd a kísérlettől függően 60 vagy 120 perces reperfúziós fázis következett.

### *3.3. Az etakrinsav adagolása*

Az etakrinsav dózisát a humán diuretikus dózisból számoltuk, mely 8,6 mg/ttkg. Az oldatot 24, illetve 1 órával a beavatkozások előtt, intraperitonealisan adagoltuk az állatoknak. A GST-gátlás hatékonyságának igazolására GST-alfa ELISA vizsgálat történt.

### *3.4. A PPARGA adagolása*

A PPARGA oldatot a kísérletnek megfelelő koncentrációkban (10, 50, 100, 500  $\mu$ M) injektáltuk a v. mesenterica superiorba, a kísérlet alapján különböző időpontokban (20, 40, 60 perccel a reperfúziót megelőzően).

### *3.5. A PTX adagolása*

Irodalmi adatokra támaszkodva 50 mg/kg dózisban határoztuk meg a PTX adagolását. Intravénásan (VMS) 30 perccel a reperfúziót megelőzően injektáltuk a szert.

### *3.6. Az iszkémiás poszt kondicionálás protokollja*

Az iszkémiás poszt kondicionálást a reperfúziós fázis legelején 4 fázisban végeztük 15 másodperc reperfúzió- 15 másodperc reokklúzió alkalmazásával.

### *3.7. Vizsgálati csoportok*

**I.** Az állatokat 6 csoportba osztottuk (10 állat/csoport). A kontroll csoportban csak medián laparotomia történt, ezen felül 20 %-os etanol oldatot kaptak az állatok az etakrinsavas oldat koncentrációjában és dózisában 24, illetve 1 órával a kísérletek előtt (control). A második csoportban 60 perces infrarenális aorta leszorítás és 120 perc reperfúzió történt (IR). Az állatok a harmadik csoportban az iszkémia-reperfúzió mellett poszt kondicionáláson estek át (PC). A negyedik, ötödik, hatodik csoport állatai az első három csoportnak megfelelő beavatkozásokon estek át, azzal a különbséggel, hogy GST-gátlóetakrinsav kezelésben is részesültek (EA-control, IR/EA, PC/EA). Az állatoktól a kísérlet

végén vérmintát gyűjtöttünk, valamint szövettani mintavétel történt az iszkémia által érintett izomból.

## **II. Hatás-idő vizsgálat**

Az állatokat 5 csoportba rendeztük. Az első csoport állatai 60 perc aorta iszkémián és 60 perc reperfúzió után PPARGA kezelés nélkül (operált, kezeletlen kontroll). A további négy csoport állatai az iszkémia-reperfúzió mellett PPARGA kezelésben is részesültek (100  $\mu$ M) rendre 0, 20, 40, 60 perccel a reperfúziót megelőzően.

## **II. Dózisvizsgálat**

Az állatokat 5 csoportba rendeztük. Az első csoport állatai 60 perc aorta iszkémián és 60 perc reperfúzió után PPARGA kezelés nélkül (operált, kezeletlen kontroll). A további négy csoport állatai az iszkémia-reperfúzió mellett 20 perccel a reperfúziót megelőzően PPARGA kezelésben is részesültek, rendre 10, 50, 100, 500  $\mu$ M koncentrációban.

Egy további dózisvizsgálatban az állatokat 5 csoportba rendeztük. Az első csoport állatai 60 perc aorta iszkémián és 60 perc reperfúzió után PPARGA kezelés nélkül (operált, kezeletlen kontroll). A további négy csoport állatai az iszkémia-reperfúzió mellett 40 perccel a reperfúziót megelőzően PPARGA kezelésben is részesültek, rendre 10, 50, 100, 500  $\mu$ M koncentrációban.

**III.** Az állatokat 5 csoportba osztottuk. A kontroll csoport állatai medián laparotomián estek át további beavatkozás nélkül, majd 3 óra elteltével termináltuk őket (control). A második csoportban 60 perces infrarenális aorta leszorítás és 120 perc reperfúzió történt (IR). Az állatok a harmadik csoportban az iszkémia-reperfúzió mellett poszt kondicionáláson estek át (IR + PC). A negyedik csoportban a 60 perces iszkémiás fázis 30. percében injektáltuk a pentoxifyllint, majd az iszkémiás fázist 120 perc reperfúzió követte (IR + PTX). Az ötödik csoportban az iszkémia-reperfúzió mellett PTX kezelés történt 30 perccel a reperfúziót megelőzően, majd iszkémiás poszt kondicionálást végeztünk a reperfúzió kezdetén (IR + PC + PTX).

### *3.8. Az oxidatív stressz paraméterek analízise*

A malondialdehid (MDA) mérése: Az MDA a sejtmembránok lipid-peroxidációjának mértékét jelző marker. Az MDA meghatározása teljes, alvadásban gátolt vérből történik fotometriás módszerrel Placer, Cushman és Johnson nyomán. [32]

A redukált glutation (GSH) és plazma tiol-csoport (-SH) szintjének meghatározása: Teljes, EDTA-val alvadásgátolt vérből Ellman-reagens felhasználásával Sedlak és Lindsay protokollja alapján történt. [33]

A szuperoxid dizmutáz (SOD) enzimaktivitását Superoxide Dismutase Assay ELISA Kit-tel (Trevigen Inc., Gaithersburg, USA) végeztük a gyártó protokollja alapján. Ez a módszer a biológiailag aktív SOD meghatározására alkalmas.

### *3.9. RNS izolálás*

Teljes RNS izolálást végeztünk veseszövetből TRI reagenssel (Sigma-Aldrich) a gyártó protokollját követve.

### *3.10. cDNS szintézis*

Komplementer DNS-t szintetizáltunk az 5 µg DNÁzzal kezelt teljes RNS-ből 20 µL mennyiség felhasználásával oligo(dT) primer és M-MuLV reverz transzkriptáz (Fermentas Revert Aid) alkalmazásával a gyártó protokollja alapján. A RTázt 70 °C-on 10-10 percig inaktívtuk.

### *3.11. Szemi-kvantitatív reverz transzkripció PCR analízis*

A szintetizált 10-szeresen hígított cDNS-ből 2 mikrolitert használtunk az amplifikációhoz, melyet 20 µL, 1 egység Taq DNS polimerázzal végeztünk 5 percig 95 °C-on, majd ezt követte 30 ciklus, mely 30 másodperc 94°C, majd 30 másodperc 60°C, 1 perc 72°C-ból állt. A folyamatot 72 °C, 5 perccel fejeztük be. 15 mikroliter PCR produktumot 1,2 %-os etídium bromidot tartalmazó agaróz géltre vittünk fel, majd szétválasztást követően előhívtuk.

### *3.12. Szérum TNF-alfa és IL-6 meghatározás*

Szérum TNF-alfa és IL-6 meghatározás céljából Rat TNF-alfa és Rat IL-6 ELISA kitet használtunk (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) a gyártó protokollját követve.

### *3.13. Szérum alfa-GST meghatározás*

A GST-gátlás effektivitásának meghatározásához Rat GST-alpha ELISA kit-et (Abnova, Taipei City, Taiwan) használtunk a gyártó protokollját követve.

### *3.14. A proapoptotikus jelátviteli utak (JNK, p38) western blot vizsgálata*

50 mg quadriceps femoris izmot homogenizáltunk jeges TRIS pufferben (50 mM, pH 8,0). A homogenizátum felülúszójának fehérjetartalmát bicinchoninic savval derítjük, hogy a

Laemmli oldat 1 mg/ml fehérjét tartalmazzon. A mintákat kétszeres koncentrációjú SDS-poliakrilamid gél-elektroforetikus pufferben tároljuk. A fehérjéket 12 %-os SDS poliakrilamid gélben futtatjuk és választjuk szét, majd nitrocellulóz membránra blottoljuk. Blokkolást követően egy éjszán át 4 °C-on az elsődleges antitesttel inkubáljuk a membránt (phospho-SAPK/JNK (Thr<sup>183</sup>/Tyr<sup>185</sup>, 1:1000 dilution; phospho-p38 MAPK (Thr<sup>180</sup>/Tyr<sup>182</sup>, 1:1000 dilution), (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). A membránokat ezt követően hatszor 5 percig mossuk Tween-es TBS-ben, majd hozzáadjuk a tormaperoxidázzal jelölt másodlagos antitestet (1:3000 dilution; Bio-Rad, Budapest, Hungary). Ismét hatszor 5 percig mossuk a membránokat Tween-es TBS-ben, majd kemilumineszcens oldattal láthatóvá tesszük a blottot, majd Scion Image Beta 4.02 programmal kvantifikáljuk az eredményt.

### *3.15. Szövettan vizsgálatok*

A kísérlet végén terminált állatokból szövettani vizsgálat céljából mintát vettünk a végtagi izomzatból. A szövettani vizsgálatok célja a csoportok közti izomszövet-változások vizuális megjelenítése volt. Csoportonként 5-6 paraffinba ágyazott blokkot készítettünk, majd metszés után hematoxylin-eozin festést végeztünk.

### *3.16. Statisztikai analízis*

Minden értéket átlag  $\pm$  SEM-mel fejeztünk ki. A csoportok varianciája közötti eltéréseket one-way ANOVA analízissel vizsgáltuk, majd szignifikáns eltérés esetén a többszörös összehasonlítások érdekében adekvát post-hoc tesztekkel végeztünk. Az eltéréseket szignifikánsnak tekintettük, ha a p kisebb volt, mint 0,05.



## **4.1. Eredmények-I**

### *4.1.1. Plazma MDA szintek*

Az MDA koncentrációja négy csoportban szignifikánsan magasabb volt a kontrollcsoporthoz viszonyítva (IR, PC, IR/EA, PC/EA). Eredményeink szignifikáns eltérést mutattak az EA-control és az IR/EA csoportok között. Az IR/EA csoportban szignifikánsan magasabb MDA szintet mértünk.

### *4.1.2. Redukált glutation szintek*

A GSH koncentrációja négy csoportban szignifikánsan magasabb volt a kontrollcsoporthoz viszonyítva (IR, PC, IR/EA, PC/EA). A poszt kondicionált csoport értékei szignifikánsan magasabbnak adódtak, mint az IR csoport értékei, azonban ez a különbség EA adása esetén nem éri el a szignifikanciaszintet.

### *4.1.3. Plazma tiol csoportok*

Csak az IR/EA csoportban találtunk szignifikánsan alacsonyabb –SH szinteket a kontrollcsoporthoz viszonyítva.

### *4.1.4. A SOD enzimaktivitása*

Három vizsgált csoportban találtunk szignifikánsan alacsonyabb (IR, IR/EA, PC/EA), egy csoportban szignifikánsan magasabb (PC) értékeket a kontrollhoz viszonyítva. A PC csoportban szignifikánsan magasabb volt a SOD enzimaktivitása, mint az IR csoportban. A PC/EA csoportban szignifikánsan alacsonyabb volt a SOD enzimaktivitása, mint az EA nélküli PC csoportban.

### *4.1.5. Szérum TNF-alfa szintek*

Szignifikánsan magasabb értékeket találtunk három csoportban (IR, IR/EA, PC/EA) a kontrollhoz viszonyítva. A poszt kondicionált csoportban nem találtunk a kontrollhoz viszonyítva szignifikáns emelkedést. Ez a poszt kondicionálás által kiváltott anti-inflammatorikus hatás EA együttes adása esetén nem látható.

### *4.1.6. Szérum IL-6*

Szignifikánsan magasabb értékeket találtunk három csoportban (IR, IR/EA, PC/EA) a kontrollhoz viszonyítva. IR/EA csoportban szignifikánsan magasabb IL-6 szintet mértünk, mint az etakrinsav kezelésben nem részesülő IR csoportban. EA kezelés nélkül a

poszt kondicionálás szignifikánsan csökkenti az IL-6 szintet. A poszt kondicionálás nem tudta szignifikánsan mérsékelni az IL-6 emelkedését az PC/EA csoportban.

#### *4.1.7. Szérum alfa-GST*

A GST-gátlás effektivitásának bizonyítására GST-ELISA analízist végeztünk. A kontrollhoz viszonyítva szignifikánsan alacsonyabb értékeket mértünk az etakrinsavval kezelt csoportokban (EA-control, IR/EA, PC/EA). Az IR csoportban szignifikánsan emelkedett GST koncentrációt mértünk a PC és a control csoporthoz viszonyítva.

#### *4.1.8. Proapoptikus jelátviteli utak (JNK, p38) western blot vizsgálata*

Két proapoptikus jelátviteli fehérje vizsgálatát végeztük el (foszfo-JNK, foszfo-p38). Eredményeink azt mutatják, hogy mind a foszfo-JNK, mind a foszfo-p38 expressziója fokozott az EA kezeléssel átesett csoportokban akár a kontroll, akár a PC, akár az IR csoporthoz viszonyítjuk.

#### *4.1.9. Szövettani eredmények*

Az IR csoportban az izomrostok kissé duzzadtak, az intersticiális tér mérete csökkent. Fokális nekrosisok láthatók az izomszövetben. A PC csoportban az izom struktúrája megtartott, minimális rostduzzadás megfigyelhető, de nekrosis nem látható. A leg súlyosabb kép az IR/EA csoport mintáiban látható. Az izomrostok dezorganizációja, intersticiális ödéma és nagyobb mértékű nekrosis figyelhető meg. A PC/EA csoportban szintén súlyos morfológiai változásokat látunk.

## **4.2. Eredmények-II**

#### *4.2.1. A hatás-idő vizsgálat eredményei*

Az alkalmazott PPARGA kezelés hatékonyan csökkentette minden tesztelt időpontban az MDA szintjét. A GSH szintek emelkedtek a kontrollhoz képest, ha a PPARGA kezelés 40 vagy 60 perccel a reperfüziót megelőzően történt. A SOD enzimaktivitása a kontrollhoz viszonyítva minden tesztelt időpontban emelkedett.

#### *4.2.2. A dóziszvizsgálat eredményei I.*

Az alkalmazott PPARGA kezelés hatékonyan csökkentette az MDA szintjét mind a 10, 50, 100, 500  $\mu$ M-os koncentrációban. 100 és 500  $\mu$ M-os koncentrációban emelkedett SOD enzimaktivitást találtunk. 50, 100 és 500  $\mu$ M-os koncentrációban 20 perccel a reperfüziót

megelőzően adva csökkentette a GSH koncentrációt. A fenti eredmények tükrében elmondható, hogy a PPARGA kezelés hatékonyabban csökkenti az iszkémia-reperfúziós károsodások mértékét, ha több, mint 20 perccel a reperfúziót megelőzően alkalmazzuk.

#### *4.2.3. A dóziszvizsgálat eredményei II.*

Az alkalmazott PPARGA kezelés hatékonyan csökkentette az MDA szintjét 100 és 500  $\mu$ M-os koncentrációban. 50, 100 és 500  $\mu$ M-os koncentrációban a PPARGA képes volt emelni a GSH szinteket, továbbá 10, 100 és 500  $\mu$ M-os koncentrációban megemelte a SOD enzimaktivitását is. A SOD génexpressziós mintája is korrelál a SOD enzimaktivitás értékeivel, így 40 perccel a reperfúziót megelőzően alkalmazva, emelkedett SOD mRNS szinteket mértünk, továbbá a PPARG mRNS expressziója is emelkedett.

#### *4.2.4. Szövettani eredmények*

Az iszkémia-reperfúziós csoportban enyhe izomrost károsodás észlelhető, a sejtvakulizáció és az extracelluláris ödémaképződés korai jelei figyelhetők meg. A PPARGA kezelés érzékelhetően képes volt ezeket a strukturális károsodásokat enyhíteni, minimális extracelluláris ödémaképződés megfigyelhető, azonban a celluláris vakulizáció nem látható.

### **4.3. Eredmények-III**

#### *4.3.1. Plazma MDA szintek*

A kontrollhoz viszonyítva valamennyi csoportban szignifikánsan emelkedett MDA szinteket mértünk (IR, IR+PC, IR+PTX, IR+PC+PTX). Az IR csoporthoz viszonyítva szignifikánsan alacsonyabb MDA szinteket mértünk az IR+PC, IR+PTX és az IR+PC+PTX csoportokban. Az IR+PC+PTX csoportban szignifikánsan alacsonyabb MDA szinteket mértünk, mint az IR+PTX csoportban.

#### *4.3.2. Plazma GSH szintek*

A kontrollhoz viszonyítva két csoportban találtunk szignifikánsan alacsonyabb koncentrációt (IR, IR+PTX). Szignifikánsan magasabb GSH szinteket találtunk az IR+PC, IR+PTX és az IR+PC+PTX csoportokban az IR csoporthoz viszonyítva.

#### *4.3.3. Plazma tiol csoportok (-SH)*

A kontrollhoz viszonyítva az IR csoportban találtunk szignifikánsan alacsonyabb koncentrációt.

#### *4.3.4. SOD enzimaktivitás*

Két vizsgált csoportban találtunk szignifikánsan emelkedett (IR+PC, IR+PC+PTX) és egy csoportban alacsonyabb (IR) SOD enzimaktivitást a kontrollhoz viszonyítva. Az IR+PC, IR+PTX és az IR+PC+PTX csoportban szignifikánsan emelkedett SOD enzimaktivitást mértünk az IR csoporthoz viszonyítva. Az IR+PC+PTX csoportban szignifikánsan magasabb SOD enzimaktivitást mértünk, mint az IR+PTX csoportban.

#### *4.3.5. Szérum TNF-alfa szintek*

Az IR csoportban szignifikánsan magasabb koncentrációt mértünk a kontrollhoz viszonyítva. Az IR+PC, IR+PTX és az IR+PC+PTX csoportban szignifikánsan alacsonyabb értékeket mértünk, mint az IR csoportban.

#### *4.3.6. Szérum IL-6 szintek*

Az IR csoportban szignifikánsan magasabb koncentrációt mértünk a kontrollhoz viszonyítva. Az IR+PTX, IR+PC és az IR+PC+PTX csoportban szignifikánsan alacsonyabb koncentrációkat mértünk, mint az IR csoportban.

## 5. Megbeszélés

I. Az iszkémia az intracelluláris ATP csökkenéséhez és a hypoxantin folyamatos emelkedéséhez vezet. A reperfüzió nagyon korai fázisában a molekuláris oxigén megjelenik a sejtben és a xantin-oxidáz által katalizált xypoxantin-xantin konverzió következtében óriási mennyiségű szuperoxid gyök keletkezik. A szuperoxid és más oxigén eredetű szabadgyökök lipidperoxidáción keresztül károsítják a membránlipideket, fehérjéket és a DNS-t. Az endogén antioxidáns enzimrendszer feladata, hogy ezekkel a károsító hatásokkal szemben megvédje a sejtet és a makromolekulákat. [4] Vizsgálataink kapcsán azt találtuk, hogy az iszkémia-reperfüzió növelte az oxidatív paraméterek plazmaszintjét, melyek tovább emelkedtek EA kezelés hatására. A poszt kondicionálás pozitív, védő hatásait megfigyeltük az oxidatív paraméterek vizsgálata kapcsán, azonban ez a védő hatás EA kezelés hatására eltűnik. [34]

Kísérletünk során azt találtuk, hogy az állatok EA-val történő kezelése markánsan emeli az oxidatív stressz paraméterek szintjét, továbbá növeli a proapoptotikus jelátviteli fehérjék expresszióját és foszforilációját. A reaktív oxigénszármazékok emelkedett szintje magyarázhatja a proapoptotikus jelátviteli fehérjék fokozott foszforilációját a GST-gátolt csoportokban iszkémia-reperfüzió és poszt kondicionálás kapcsán. [35]

A GST-k kapcsolatban állnak a MAPK-út tagjaival. Ezek az útvonalak jelentős szerepet játszanak a sejt túlélése-, illetve halála jelátviteli mechanizmusaiban. [36] A GST-pi bizonyult az első JNK-inhibitornak, mely direkt fehérje-fehérje kölcsönhatás révén fejt ki hatását. [37] A JNK egy proapoptotikus MAPK, mely fontos szerepet játszik bizonyos körülmények között- oxidatív stressz, nitrozatív stressz, stressz válasz, gyulladásos válasz, apoptózis- a citotoxicitásban. [38, 39] Normál, stresszmentes állapotban a JNK katalitikus aktivitása a sejten belül alacsony, mivel a GST-pi, JNK és a c-Jun egy fehérjekomplexet alkot. [10] Ettől eltérő körülmények esetén, mint amilyen az oxidatív stressz, a GST-pi-JNK komplex disszociál, így a szabadabbá váló JNK visszanyeri foszforilációs képességét, ezáltal szabadon képes a hatását további célgének kifejtetni, melynek eredménye a sejt apoptózis-indukciója. [40] Ez magyarázhatja az általunk is megfigyelt JNK foszforilációban történő változást. Ezen túlmenően a JNK aktivációja létrejöhet a keletkező oxidánsok elnyújtott, lassú eliminációja miatt. Sun és munkatársai közleménye igazolta, hogy a poszt kondicionálás eredményeként csökken a keletkező oxidánsok mennyisége, s ezzel párhuzamosan csökken a JNK és a p38 MAPK-ok aktivációja és a következményes apoptózis-indukció. Ezzel azt is felvetik, hogy a MAPK jelátviteli utak modulációja befolyásolhatja a poszt kondicionálás által kiváltott védelmet. [41]

**II.** A második kísérletsorozatban természetes, nem szintetikus PPARGA-t alkalmaztunk. Vizsgálataink során azt találtuk, hogy a PPARGA kezelés képes volt csökkenteni az iszkémia-reperfúziós károsodások mértékét a szisztémás gyulladásos válasz csökkentésén keresztül. A PPARG agonisták iszkémia-reperfúzióban kifejtett pozitív hatását közölték már vékonybélben, [21, 22, 23] tüdön, [24] szíven, [25, 26, 27] vesén [28] és a közelmúltban agyon is. [29, 30]

A hatás-idő vizsgálatok kapcsán azt találtuk, hogy az MDA szintje csökkent, a GSH emelkedett, ha a PPARGA alkalmazása 40 vagy 60 perccel a reperfúzió előtt történt. A SOD enzimaktivitása -minden tesztelt időpontban adva a PPARGA-t- emelkedett.

Az első dóziszvizsgálat alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a PPARGA már 10  $\mu$ M-os koncentrációban is potensen csökkentette az iszkémia-reperfúziós károsodások mértékét. 100 és 500  $\mu$ M-os koncentrációban a SOD enzimaktivitását is képes volt fokozni. Mivel a GSH szintek csökkenését figyeltük meg, ha 20 perccel reperfúzió előtt alkalmaztuk a PPARGA-t, így a hatás-idő vizsgálattal konzisztensen kijelenthető, hogy hatásosabban csökkenti az iszkémia-reperfúziós károsodásokat, ha több, mint 20 perccel a reperfúzió előtt alkalmazzuk.

A második dóziszvizsgálat eredményei alapján kijelenthetjük, hogy a PPARGA 100 és 500  $\mu$ M-os koncentrációban alkalmazva hatásosan csökkentette az MDA szintjét.

A reaktív oxigén eredetű szabadgyökök fő forrása a mitokondrium, ezen belül is a légzési lánc I-es és III-as komplexe. [42] Nemrégiben bizonyítást nyert, hogy a rosiglitazon és a pioglitazon képes gátolni a légzési lánc I-es [43] és III-as [44] komplex aktivitását. A PPARGA részlegesen szétkapcsolja a mitokondriális légzési láncot, ez érinti az elektrontranszportot és a szuperoxid termelést is. A legfrissebb kutatások leírtak egy új mitokondriális célfehérjét, melyen a PPARG agonisták kifejthetik hatásukat (mito-NEET). [45] A mito-NEET-ről bizonyítást nyert, hogy kapcsolatban áll a III-as komplex komponenseivel, ez magyarázhatja a PPARGA-k kötődési képességét a mito-NEET-hez, így szelektíven képesek blokkolni különböző mitokondriális célmolekulákat. A PPARGA-k ezen hatása, hogy képesek befolyásolni a mitokondriumok funkcióját, magyarázhatja reaktív oxigén intermedierek hatásukra történő csökkent képződésének okát.

**III.** A pentoxifyllin (PTX) egy nem specifikus foszfodiészteráz-gátló, mely régóta használatos a klaudikáció intermittens kezelésére alsó végtagi verőérbetegeken. [31] Hemoreológiai hatásai révén képes a vörösvérsejtek konformációját megváltoztatni, ezáltal növelni a mikrocirkulációs vérátáramlást krónikus artériás elégtelenség esetén. Újabban a PTX alkalmazása kibővült, bizonyítást nyert, hogy képes a gyulladásos válaszreakciók

csökkentésére. A PTX képes csökkenteni a gyulladásos folyamatot kardiopulmonális bypasszal járó nyitott szívműtétet követően, sepsisben, illetve újszülöttek ARDS-e kapcsán. Többszörös pozitív hatást képes kifejteni a gyulladásos kaszkádban az intracelluláris cAMP növelése és a TNF-alfa, illetve az IL-6 szintézis csökkentése révén. [46, 47]

Az NFkB egy transzkripció faktor, mely kétélű fegyverként viselkedik a szöveti folyamatokban. Aktivációja elengedhetetlen a késői prekonkondicionálás kialakulásában, mivel up-regulálja az iNOS és a COX-2 géneket.

A PTX és a transzkripció faktorok közti kapcsolat már tisztázott. A PTX dóziszfüggő módon csökkenti az NFkB nukleáris transzlokációját LPS kezelés hatására, [48] továbbá az aktivált T-limfocitákban is gátolja a transzlokációt. [49] Vizsgálataink során azt találtuk, hogy a PTX képes volt csökkenteni az iszkémia-reperfúziós károsodások mértékét és markánsan csökkentette a gyulladásos mediátorok szintjét. A közelmúltban El-Ghoneimi és munkatársai közölték, hogy a PTX képes volt szignifikánsan csökkenteni a TNF-alfa szintjét és a nekrotikus terület nagyságát májban. Úgy tűnik, hogy a PTX képes lehet a proinflammatorikus mediátorok szintjének- mint az IL-6- csökkentésére, valamint a mikrovaszkuláris máj és bélkeringés növelésére vérzéses sokkot követően. [51, 52, 53, 54] Vizsgálataink során mi is azt találtuk, hogy a PTX képes volt csökkenteni a TNF-alfa és az IL-6 szintjét. Vizsgálatunk is megerősítette, hogy a PTX rendelkezik antiinflammatorikus hatással, melyet a TNF-alfa, IL-6 gátlásán, a neutrofil leukociták kitapadásának gátlásán és a vérlemezék aktivációjának gátlásán keresztül fejt ki.

## 6. Következtetés

Vizsgálataink eredménye alapján elmondhatjuk, hogy az iszkémiás poszt kondicionálás, mely egy endogén adaptációs mechanizmus, csökkentette az oxidatív stressz mértékét és a gyulladásos válaszreakciók nagyságát. Jelen tanulmányunkból leszűrhetjük, hogy a GST etakrinsavval történő gátlása a proapoptotikus JNK és p38 fokozódó foszforilációjához vezet, valamint csökkenti az iszkémiás poszt kondicionálás pozitív hatását. A vizsgálatunk klinikai jelentősége abban áll, hogy az iszkémiás poszt kondicionálás egy gyors, egyszerű, könnyen alkalmazható eljárás a műtétet követően kialakuló reperfüziós károsodások csökkentésére. Az ér betegeknél alkalmazott etakrinsav súlyosbíthatja az iszkémia-reperfüziós károsodások mértékét, továbbá a poszt kondicionálás pozitív hatását is eltörölheti, így ezeknél a betegeknél megfontolandó az etakrinsav elhagyása, illetve helyettesítése.

A második kísérletsorozat eredményei alapján megállapíthatjuk, hogy a PPARGA alkalmazása aorta iszkémia-reperfüziót követően csökkentette az oxidatív károsodások mértékét. Vizsgálataink igazolták, hogy a PPARGA képes csökkenteni az MDA szintjét, emelni a GSH és -SH koncentrációját, valamint fokozni a SOD enzimaktivitását. A PPARGA már 10 és 50  $\mu\text{M}$ -os koncentrációban is kellően hatékony, továbbá a legígéretesebb eredményeket akkor látjuk, ha több, mint 20 perccel a reperfüzió előtt alkalmazzuk. Klinikai haszna, hogy könnyen, gyorsan alkalmazható, természetes anyag, mely a reperfüziót megelőzően adva fejti ki legmarkánsabban a hatását, így egy akut érelzáródás műtéti megoldásánál terápiás lehetőségként számolhatunk vele.

A harmadik kísérletsorozat eredményei alapján elmondhatjuk, hogy a PTX adása hemoreológiai és anti-inflammatórikus hatásai révén képes csökkenteni az iszkémia-reperfüziós károsodások mértékét és a gyulladásos válaszreakciók nagyságát. A vizsgált pro-inflammatórikus mediátorok eredményei alátámasztják, hogy a PTX, hemoreológiai támadáspontjain kívül anti-inflammatórikus és immunmodulációs potenciállal is rendelkezik.



## 7. Új eredmények

1. Elsőként demonstráltuk in-vivo állatkísérletben, hogy a GST farmakológiai gátlása súlyosbíthatja az iszkémia-reperfúziós károsodások mértékét infrarenalis aorta okklúziót követően. Továbbá bizonyítottuk, hogy a GST-gátlás összefügg különböző MAPK aktivációjával, melyek pro- és antiapoptotikus jelátviteli utakat szabályoznak.

2. Elsőként írtuk le in-vivo állatkísérletben, hogy az iszkémiás poszt kondicionálás védő hatása nem alakul ki etakrinsavval történő GST gátlás esetén. A hypoxia és reoxigenizáció képes volt csökkenteni a JNK és p38 aktivációját, ezáltal feltételezhetjük, hogy a MAPK jelátviteli utak részt vesznek a poszt kondicionálás-kiváltotta védelem kialakításában.

3. A PPARG agonisták iszkémia-reperfúziós károsodásokra gyakorolt hatását már közzétették vékonybélben, tüdőben, szíven, vesén és agyszövetben. Elsőként demonstráltuk a PPARGA iszkémia-reperfúziós károsodásokra gyakorolt pozitív hatását in-vivo alsó végtagi vázizom modellen.

4. Elsőként végeztünk az általunk vizsgált PPARGA-val hatás-idő és dózis vizsgálatokat az optimális időzítés és dózis meghatározása érdekében, mellyel hatékonyan csökkenteni tudtuk in-vivo állatmodellen az iszkémia reperfúziós károsodások mértékét infrarenalis aorta leszorítást követően.

5. Igazoltuk in-vivo állatmodellben, hogy a pentoxifyllin az eddig ismert hatásain túl anti-inflammatorikus hatással is bír infrarenalis aorta iszkémia-reperfúziót követően, melyet a TNF-alfa és IL-6 szintézisének gátlásán keresztül fejt ki.

6. Egyszeri, nagy dózisú (50 mg/kg) pentoxifyllin alkalmazása képes az iszkémiás poszt kondicionálás pozitív hatásait potenciózni infrarenalis aorta iszkémia-reperfúzió állatmodellben.

## **Köszönetnyilvánítás**

Elsőként szeretném megköszönni családomnak a szeretetet és támogatást, amivel körülvettek, feleségemnek Helgának és kislányomnak Dórinak, hogy biztattak, és szeretetükkel támogattak a nehezebb időszakokban is.

Szeretném megragadni az alkalmat, hogy kifejezzem köszönetemet a támogatásért, melyet munkám során kaptam témavezetőmtől Dr. Arató Endrétől és a Doktori Program vezetőjétől Dr. Jancsó Gábortól, hogy ez a munka elkészülhessen.

Szeretném megköszönni a segítséget kollégáimnak Dr. Hardi Péternek, Dr. Takács Ildikónak, Kovács Viktóriának, Dr. Veres Gyöngyvér Tündének, Dr. Kürthy Máriának, Dr. Lantos Jánosnak és a Sebészeti Oktató és Kutató Intézet valamennyi munkatársának, hogy az állatkísérletek és a laboratóriumi munkák sikeresen lezajlottak.

Szeretném megköszönni Nagy Ágnesnek és Kovács Viktóriának a pótolhatatlan segítséget, melyet a molekuláris biológiai vizsgálatok során kaptam.